

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MARCELLE MAIA KORSANKE**

**COLÔNIAS SUSPEITAS DE *Vibrio parahaemolyticus* EM OSTRAS CULTIVADAS NA
BAÍA DE PARANAGUÁ, PARANÁ**



**PONTAL DO PARANÁ – PARANÁ
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MARCELLE MAIA KORSANKE**

**COLÔNIAS SUSPEITAS DE *Vibrio parahaemolyticus* EM OSTRAS CULTIVADAS NA
BAÍA DE PARANAGUÁ, PARANÁ**

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do Curso superior de Tecnologia em Aquicultura, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Terra.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Luciene Correa Lima

**PONTAL DO PARANÁ
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA
CENTRO DE ESTUDOS DO MAR
Campus Pontal do Paraná



TERMO DE APROVAÇÃO

Marcelle Maia Korsanke

ISOLAMENTO DE COLÔNIAS SUSPEITAS *Vibrio parahaemolyticus* EM
OSTRAS CULTIVADAS NA BAIÁ DE PARANAGUÁ, PARANÁ

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para a
obtenção do grau de Tecnólogo em Aquicultura, da Universidade Federal do
Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Luciene Correa Lima
Orientador(a) e Presidente(a)

Dr. Rodolfo Luis Petersen
Membro Examinador(a)

Msc. Daniele Priscila Conceição
Membro Examinador(a)

Avenida Beira Mar s/n - Caixa Postal: 61
Bairro Pontal do Sul
Paraná - PR - 83255-976
Tel: 41 3511-9600 - Fax: 41 3511-8648

www.cem.ufpr.br

Rua Rio Grande do Norte, nº 145
Bairro de Mossa
Paraná - PR - 83255-000
Tel: 41 3511-2148 - Fax: 41 3511-8648

RESUMO

O consumo de moluscos bivalves marinhos vem crescendo no Brasil. No litoral paranaense, a ostreicultura vem se consolidando, inclusive como uma alternativa para a geração de renda para comunidades pesqueiras tradicionais. Ostras se alimentam por filtração e podem reter em seus tecidos diferentes micro-organismos, incluindo bactérias do gênero *Vibrio*, algumas das quais são particularmente prejudiciais à saúde do homem, como *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*. Sendo assim, o monitoramento sanitário em maricultura é de importância para a sanidade aquícola e para a saúde pública. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias do gênero *Vibrio* quanto ao uso da sacarose, selecionando especialmente colônias suspeitas de *V. parahaemolyticus*, em *Crassostrea* spp. cultivadas na Ilha do Mel, PR. As amostras foram estudadas em junho de 2016. Ostras do lote 1 (L1) ficaram estocadas por 15 dias em refrigerador a 8 °C, antes do seu processamento, enquanto as ostras do lote 2 (L2) foram processadas logo após ser retiradas das lanternas de cultivo. De cada lote, foram abertas 5 ostras, adicionadas de 500 µl de água destilada para maceração de sua carne. Então, 100 µl deste caldo foram espalhadas com alça Drigalsky, em placas de Tiosulfato Citrato Sais de Bile (TCBS) e logo incubadas a $33 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 h. As colônias crescidas em TCBS, nas cinco amostras, chamadas de colônias suspeitas, foram contadas no seu total e classificadas conforme a utilização da sacarose (SAC) do meio, sendo verde SAC - ou amarela, SAC +. Na sequência, quatro suspeitas por placa (denominadas sub amostras), foram selecionadas, repicadas em novas placas de TCBS e incubadas a $33 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 h. Após, foram transferidas para meio soja tripticase (TSA) enriquecido com 2% de NaCl, e igualmente incubadas, para realização de testes de coloração de Gram, Oxidase, Catalase, Sulfeto, Indol, Motilidade, resistência a concentrações de cloreto de sódio, e testes de aminoácidos. Em L1, dentro do total geral de 2.625 colônias, cresceu maior quantidade de SAC+ (2.600). Já em L2, o crescimento foi semelhante entre as colônias amarelas e as verdes, ou seja, 147 SAC+ e 137 SAC-. O total geral em L2 foi de 284 colônias, onde duas amostras testaram positivo para sulfeto. No teste SIM, apenas 30% das amostras de L1 apresentaram motilidade, diferente de L2 em que 90% foram motilidade positiva. Em L2, 70% das sub amostras cresceram no TSA com 7% de concentração de sal. Tal resultado reforça a probabilidade da presença de *V. parahaemolyticus* dentre as colônias isoladas, já que esta espécie resiste a maiores salinidades (até 9%) em relação a outros vibriões. Considerando o total de amostras inoculadas, o crescimento de colônias suspeitas em TCBS foi de praticamente 100%. Comparando os dois lotes testados o total de colônias suspeitas crescidas em L1 foi praticamente 10 vezes maior do que em L2. Apesar da identificação de falhas em relação à condução de determinados testes, foi possível identificar e selecionar colônias suspeitas de *Vibrio parahaemolyticus* para posterior confirmação.

Palavras chave: Aquicultura, ostreicultura, vibriose, Sanidade Aquícola, Saúde pública.

ABSTRACT

Consumption of marine bivalve mollusks is growing in Brazil. In Paraná coast, oyster farming has become a solid activity and an alternative source of income for traditional fishing communities. Oysters feed by filtration and may retain in their tissue a variety of micro-organisms, including bacteria of the genus *Vibrio*, some of which are particularly harmful to human health, such as *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus*. Thus, a sanitary monitoring in mariculture is relevant to both aquaculture and public health. The objective of this study was to isolate and characterize bacteria *Vibrio* on their use of sucrose and to select colonies suggestive of *V. parahaemolyticus* in *Crassostrea* spp. grown at Ilha do Mel, PR. The samples were studied in June 2016. The batch of oysters in Lot 1 (L1) was stored for 15 days under 8 ° C before processing, while the oysters from Lot 2 (L2) were processed immediately after being removed from the lanterns. From each lot 5 oysters were opened and individually added 500 µL of distilled water to allow maceration of their flesht. Then, a 100 µL of this broth were spread with Drigalski handle on thiosulfate citrate bile salts (TCBS) plates and then incubated at 33 ± 1 ° C for 24 h. The total colonies grown in the 5 TCBS plates, named “suspect”, were counted and classified according their use of sucrose (SAC) of the medium, being green SAC⁻ or yellow SAC⁺. Then, 4 colonies from each plate, named “sub samples” were selected, streaking in new TCBS plates and incubated at 33 ± 1 ° C for 24 h. These colonies were then transferred to trypticase soy medium (TSA) supplemented with 2% NaCl for performing complementary tests such as Gram staining, Oxidase, Catalase, sulfide, indole, motility, resistance to sodium chloride concentrations, and aminoacids tests. In L1, within the overall total of 2,625 colonies, there was a larger amount of SAC + (2,600). In L2 growth between the green and yellow colonies was similar 147 SAC +and 137 SAC⁻, respectively. The grand total in L2 was 284 colonies two of those tested positive for sulfide. In the SIM test, only 30% of the samples of L1 were motile. In contrast, 90% of the subsamples in L2 had motility. In L2, 70% of the subsamples grew in 7% of NaCL, which increases the likelihood of being *V. parahaemolyticus*, as this pathogen resists higher salinities (9%) in comparison with other species from this same genus. Overall, while the growth of colonies in TCBS was almost 100%, the suspects in L2 were almost 10 times greater than L2. Despite few failures in performing additional tests, it was possible to identify and select colonies of *Vibrio parahaemolyticus* for further confirmation.

Keywords: Aquaculture, oyster farming, vibriosis, Aquaculture health, Public health.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me conceder saúde e forças para ter enfrentado os obstáculos dessa caminhada e os perigos da estrada.

A minha mãe Dionar que insistentemente me pedia para terminar o curso.

Aos meus tios e colaboradores, Paulo e Terezinha, gratidão imensa e eterna, que me incentivaram para nunca desistir, mesmo quando a vontade de desistir era imensa, por eles fui até o fim.

A minha querida irmã Michele, que por muitas vezes, colaborou para eu seguir nessa minha caminhada.

Ao meu companheiro Luiz Cezar, que também por muitas vezes, colaborou para eu seguir nessa minha caminhada.

A professora Luciene Lima, minha orientadora, com quem aprendi muito e a quem serei eternamente grata por ter me orientado nesse trabalho.

Ao meu querido amigo Laertes, um homem bondoso que com sua boa vontade me trouxe as amostras das ostras.

Ao professor Rodolfo Petersen, que por muitas vezes me ajudou a contornar situações quase perdidas, meu muito obrigado.

A técnica do laboratório Danielle Priscila Conceição, que com toda sua paciência e delicadeza me auxiliou em todas as atividades do laboratório e me tirou muitas dúvidas surgidas no decorrer do meu trabalho.

A minha colega de laboratório Ana Beatriz Vilas Boas, que sempre esteve disposta a me ajudar em todas as atividades do laboratório, meu muito obrigado.

A todos meus colegas de turma, por tê-los conhecido, pelos trabalhos realizados, pela amizade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Origem das amostras.....	13
4.2 Coleta das amostras.....	13
4.3 Procedimento Laboratorial.....	14
4.4 Testes.....	15
4.4.1 TCBS.....	15
4.4.2 Coloração de Gram.....	16
4.4.3 Oxidase.....	16
4.4.4 Catalase.....	16
4.4.5 Meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade).....	16
4.4.6 Meio LMI – LISINA, MOTILIDADE, INDOL.....	17
4.4.7 Meio MIO – MOTILIDADE, INDOL, ORNITINA.....	17
4.4.8 Caldo ARGININA.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
7. CONCLUSÃO.....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
9. ANEXOS.....	29

1 . INTRODUÇÃO

A percepção dos oceanos como fonte inesgotável de recursos para suprir as necessidades humanas, principalmente em termos de alimentos, tem afetado significativamente os ecossistemas marinhos. A estagnação das capturas da pesca e o crescimento da demanda por pescado indicam que a produção de alimentos de origem marinha é insuficiente para atender as necessidades globais. Em vista disso, a aquicultura pode ser um dos caminhos mais eficientes para a redução do *déficit* entre a demanda e a oferta no mercado mundial de pescado. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), em 1970 a aquicultura era responsável por apenas 3,9% de todo pescado consumido no mundo, mas em 2006 sua participação na produção mundial de pescado já havia chegado a 47%. Acompanhando a tendência mundial, a aquicultura brasileira também vem aumentando sua participação na produção de pescado. Em 1995, eram produzidos apenas 46 mil toneladas (ou 7,1% da produção total), mas em 2007 esta taxa passou para 27,0%, ou 289 mil toneladas produzidas (Cavalli e Ferreira, 2010).

O Brasil apresenta ótimas condições para a expansão da maricultura principalmente devido a sua privilegiada extensão litorânea (8,5 mil km), e mais de 2,5 milhões de hectares de áreas estuarinas protegidas. Com o Programa Nacional de Parques Aquícolas, cujo objetivo é delimitar áreas propícias para aquicultura em águas de domínio da União, a produção de bivalves ganha força extra. A delimitação desses parques em ambientes marinhos vem sendo executada a partir dos Planos Locais de Desenvolvimento da Maricultura (PLDM). A realização de programas regulares de sanidade, com monitoramento de áreas de cultivo, incluindo de contaminação por bactérias coliformes e por algas tóxicas, também tem significado progresso para a maricultura brasileira (MAPA, 2016). No litoral paranaense, a produção de animais marinhos também vem se apresentando como opção de negócio para comunidades locais (ALMEIDA, 2010). A ostreicultura, em particular, vem se consolidando como uma das principais

alternativas para a geração de renda de comunidades que, até então, viviam essencialmente da pesca artesanal. De acordo com a Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Paraná (SEMA), atualmente 103 famílias contam com licenças de instalação e manejo das culturas de ostras, em oito regiões produtoras ao longo do litoral, tais como Guaratuba, Matinhos e Ilha do Mel.

No sul do Brasil, Santa Catarina é o estado que domina a maricultura de bivalves e, dentre as espécies produzidas de bivalves, destacam-se o mexilhão (*Perna perna*) e a ostra japonesa (*Crassostrea gigas*). Há também uma pequena, porém crescente produção de vieiras (*Nodipecten nodosus*). Diferentemente de SC, no estado do Paraná não é permitido produzir ostras exóticas, portanto, nos cultivos paranaenses se encontram as nativas *C. rhizophorae* e *C. gasar* (ou *C. brasiliiana*).

As espécies do gênero *Crassostrea* são consideradas eurihalinas e euritêrmicas, desenvolvendo-se muito bem em estuários. (VILAR, 2012). A ostra *rhizophorae* se distribui do Caribe ao Uruguai e seus principais habitats são as raízes aéreas do *Rhizophorae mangle* e os substratos duros, como rochas no médio litoral, na região entremarés. A distribuição da *C. brasiliiana* se dá naturalmente em costões rochosos, em raízes de mangues na região entremarés e ocorre de Santa Catarina ao Pará. Em geral, as ostras nativas são encontradas no médio litoral e no infralitoral de estuários rasos e protegidos. Este gênero reúne características de interesse econômico, dentre as quais são relativamente de rápido crescimento e maturação sexual, além do valor alimentício da carne (CASTANHO, 2014).

Como os demais bivalves, ostras se alimentam de partículas e plâncton através do processo de filtração da água, podendo reter em seu interior diversos micro-organismos e patógenos, incluindo o gênero bacteriano *Vibrio*, de que determinadas espécies são particularmente prejudiciais à saúde do homem, podendo mesmo ser fatais.

Vibrio spp. são bactérias Gram-negativas pertencentes à família *Vibrionaceae*. As células têm a forma de bastonetes (bacilos), frequentemente curvados, e são móveis por flagelos. Das dezenas de espécies isoladas de *Vibrio*,

pelo menos doze são patogênicas para os humanos, com destaque para *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, e *V. vulnificus*. Outras espécies como *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus* e *V. carchariae* são também potencialmente problemáticas.

A espécie *parahaemolyticus*, particularmente alvo de vigilância e estudos devido a sua virulência, tem a temperatura de 37°C como ideal para seu desenvolvimento, mas também consegue crescer em ambientes entre 5 e 43°C. Apesar dessa faixa larga, é destruída quando exposta a temperaturas superiores a 63°C. O *V. parahaemolyticus* pode também ser destruído por desidratação, e é sensível à refrigeração, diminuindo em número ao longo do tempo. É essencialmente uma bactéria halofílica, crescendo bem em concentrações de NaCl de 3%, tolerando até 8,0%.

Em humanos, a infecção por bactérias *Vibrio* pode se dar por contato com água contaminada, mas principalmente ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados. O pescado, sobretudo moluscos, é altamente associado com a vibriose humana. Dentre os principais sinais clínicos, destacam-se as manifestações gastrintestinais, diarreias e vômitos (Rojas *et al*, 2011).

No caso de vibriose causada por *V. parahaemolyticus*, a manifestação clínica mais comum é a gastroenterite, com um período médio de incubação de 15 a 19 horas e curso de 2 a 3 dias. Os principais sintomas são dores abdominais, náuseas, vômitos e febre. Em casos severos e prolongados pode haver outros sintomas mais graves como uma infecção generalizada e até morte do paciente (RODRIGUES, 2009). O consumo de bivalves *in natura*, favorece a atuação das toxinas TDH (Hemolisina termoestável direta), TRH (Hemolisina TDH-relacionada) e TLH (Hemolisina termolábil), reconhecidas como principais fatores de virulência do *parahaemolyticus*, capazes de acometer gravemente o indivíduo contaminado.

Na aquicultura, *V. parahaemolyticus*, que já é bastante problemático para o cultivo de camarões, foi recentemente confirmado também como o agente da “síndrome da mortalidade precoce”, ou EMS (sigla em inglês). O agente é transmitido via oral, causando destruição dos tecidos e do hepatopâncreas dos

camarões (Loc tran *et al*, 2013). A EMS surgiu em 2009 e, devido a sua gravidade os surtos vem trazendo perdas impactantes para a carcinocultura (De Schryver *et al.* , 2014).

Já na produção de moluscos bivalves, especialmente nas primeiras fases de vida, *V. parahaemolyticus* pode causar mortalidades de até 100% das larvas, com redução da produtividade e altas perdas econômicas (Romalde *et al.* , 2014). A espécie *parahaemolyticus* é comumente encontrada em associação com diferentes espécies de plâncton marinho. O plâncton, portanto, exerce papel fundamental, tanto na difusão de *Vibrio* spp. no ambiente (NEWMAN, 2015) quanto na acumulação destes agentes dentro dos moluscos bivalves.

Em termos de saúde pública, considerando surtos de doenças relacionadas com o consumo de frutos do mar, é importante e necessária a adoção de medidas preventivas para o controle de veiculação dos agentes. Essas medidas incluem: a seleção e conhecimento da área de extração ou de cultivos aquícolas, isto é, águas livres de contaminação. Incluem também práticas de depuração após captura, além do controle da qualidade de água e das algas que as ostras usam como alimento (CHALCOSKI, 2014).

No Brasil, o monitoramento sanitário de moluscos cultivados é de responsabilidade do Ministério da Agricultura, através do Programa Nacional de Controle Higiênico-sanitário de Moluscos Bivalves, PNCMB. Por sua vez, a qualidade bacteriológica dos pratos à base de pescado é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelecendo que a carne de moluscos bivalves *in natura*, resfriada ou congelada, está apta para o consumo humano quando a bactéria *Salmonella* sp. estiver ausente em 25g do produto analisado. O limite máximo permitido de *V. parahaemolyticus* é apenas estabelecido para pratos prontos a base de pescado, sendo este de 10³ bactérias por grama de amostra. Os limites de micro-organismos tolerados pela RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 12/01 do Ministério da Saúde, para moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, referem-se apenas aos

moluscos não consumidos crus, apesar de, na prática, o consumo de bivalves ocorra predominantemente *in natura* (CHALCOSKI, 2014).

A adoção de medidas preventivas para o controle de patógenos em aquicultura e de saúde dos consumidores requer pesquisas, conforme propôs este TCC.

2. JUSTIFICATIVA

As bactérias do gênero *Vibrio* e, particularmente a espécie *V. parahaemolyticus* são de grande importância tanto para a aquicultura quanto para a saúde pública, porém, o que se sabe é que os estudos referentes a essas bactérias no litoral paranaense ainda são muito básicos e insuficientes para se traçar um mapa microbiológico do comércio de pescado, com seus pontos críticos de controle e ações para prevenção e correção dos mesmos. Os resultados deste trabalho poderão auxiliar no mapeamento das boas condições sanitárias das ostras produzidas na baía de Paranaguá.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar, quantificar, caracterizar e comparar bactérias do gênero *Vibrio* quanto ao uso da sacarose, em amostras de ostras (*Crassostrea* spp) cultivadas na comunidade da Ponta Oeste da Ilha do Mel, PR.

3. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar e quantificar colônias de acordo com sua utilização de sacarose no meio de cultura;

Selecionar colônias suspeitas de *Vibrio parahaemolyticus* para posterior trabalho de confirmação.

4.3 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

Os meios de cultura foram preparados no próprio Laboratório de Sanidade Aquícola do CEM, em placas estéreis e descartáveis, a partir de formulações comerciais idôneas.

As ostras foram externamente bem escovadas e lavadas em água limpa e corrente. Em seguida, foram aleatoriamente abertas 5 unidades (denominadas *amostras*), com faca de lâmina curta e inoxidável. Foram adicionados e macerados à carne de cada uma das ostras, 500 µl de água destilada para a então coleta de 100 µl deste caldo, para inoculação mediata, por meio de espalhamento com alça Drigalsky, em placas de Petri contendo meio de cultura Tiossulfato Citrato Sais de Bile, TCBS (*Difco*, Becton-Dickinson, França), recém-preparadas. As placas foram, em seguida, incubadas a $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 h, em estufa bacteriológica (*Quimis*—modelo Q316M2).

As colônias crescidas nas cinco amostras das placas de TCBS foram contadas no seu total e classificadas conforme a utilização da sacarose do meio, indicada pela coloração verde ou amarela das colônias. Na sequência, 4 colônias (denominadas *subamostras*) por placa, foram selecionadas, repicadas em novas placas de TCBS e deixadas em estufa $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 h. Após, foram transferidas para um meio de manutenção, o ágar soja tripticase, TSA (*Himedia Labs*, Índia) enriquecido com 2% de NaCl, e incubadas a $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 h, para posterior realização dos testes adicionais, provas bioquímicas e estocagem dos isolados (Figura 3). Deu-se preferência à seleção de colônias verdes, pois *V. parahaemolyticus* pertence ao grupo dos vibriões sacarose negativos.

Os testes utilizados para a seleção de amostras suspeitas de *Vibrio* foram coloração de Gram, Oxidase, Catalase, Sulfeto, Indol, Motilidade, resistência a concentrações de cloreto de sódio, e testes dos aminoácidos arginina, lisina e ornitina. Esses testes estão descritos em detalhes, adiante.

Os dados foram tabulados no programa Excel (Microsoft Windows)

Material e métodos

Esquema do Processamento das Amostras

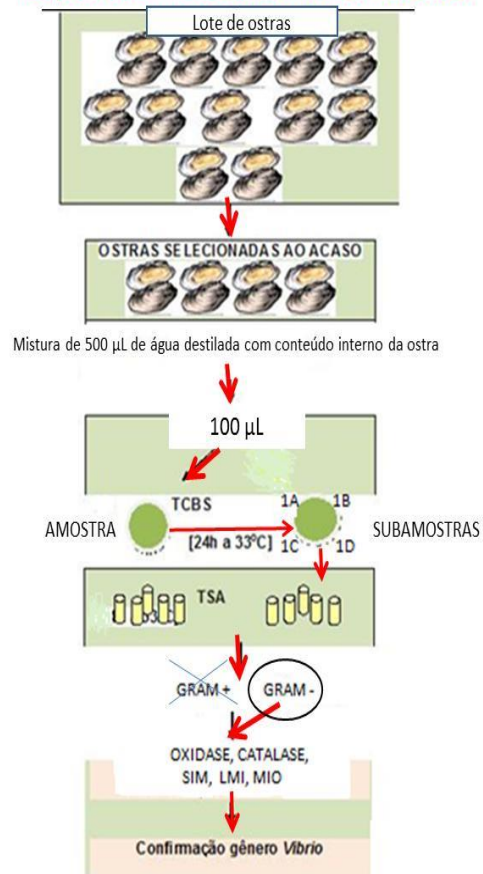


Figura 2: Diagrama ilustrando a sequência do processamento das ostras para isolamento e identificação de *Vibrio* spp.

4.4 TESTES

4.4.1. TCBS

As colônias crescidas em meio TCBS, após incubação por 24 h a 33°C, foram classificadas em negativas ou positivas conforme a utilização de sacarose do meio, colônias verdes, não fermentadoras do açúcar, são sacarose negativa (SAC-), e as amarelas, fermentadoras de açúcar, são sacarose positiva (SAC+).

4.4.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi feita usando químicos comerciais (*Laborclin* Pinhais, PR), em colônias puras e recém-crescidas em meio TSA com 2% de NaCl. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico (*Carl Zeiss Primostar*, Germany). Os isolados suspeitos foram selecionados de acordo com o resultado da morfologia de bastonetes e com a cor vermelha das colônias.

4.4.3 Oxidase

Foram utilizadas tiras de papel embebidas em reativo de indofenol, prontas para uso (*Newprov*, Pinhais, PR). Com o auxílio de uma alça plástica descartável, transferiu-se uma porção do cultivo bacteriano para a tira, friccionando-a e observando o desenvolvimento de cor dentro de até 30 segundos. A coloração azul/roxa indica reação positiva, enquanto se permanecer a coloração da própria colônia, o resultado para oxidase é negativo.

4.4.4 Catalase

Uma porção da colônia bacteriana foi esfregada sobre uma lâmina de vidro limpa e uma gota de H₂O₂ a 10% (*ADV Farma*, SP) foi adicionada. Após aproximadamente 40 segundos, a formação de bolhas sobre a amostra indica resultado positivo. A não formação de bolhas é considerada resultado negativo.

4.4.5 Meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade)

O meio SIM permite a realização do teste de 3 provas simultaneamente, sulfeto, indol e motilidade. Foram utilizadas as sub amostras crescidas em TSA contendo 2% de NaCl, as quais foram inoculadas com agulha metálica no meio e incubadas a 33°C por 24 h.

A presença sulfureto de ferro ocorre ao longo da linha de inoculação e indica que houve produção de sulfureto de hidrogênio. Então, foi considerado positivo o isolado que desenvolveu coloração negra no ágar. Para prova de indol, 4 gotas do reativo Kovac foram adicionadas na superfície do meio. O surgimento de um anel com coloração vermelha indica que a bactéria possui triptofanase,

caracterizando-a como reação positiva. Se o anel permaneceu com a cor do reagente, a reação ao Indol foi negativa. Já para a prova de motilidade, o resultado positivo foi evidenciado pelo crescimento difuso a partir da linha da picada, tornando o meio turvo.

4.4.6 Meio LMI – LISINA, MOTILIDADE, INDOL (*Newprov Laborclin*)

As bactérias foram inoculadas com agulha metálica no meio LMI, preparado com 2% de NaCl, e incubadas a 33°C por 24 h. Para a prova de lisina, o resultado positivo é quando ocorre o desenvolvimento de coloração que passa do amarelo ao púrpura no meio; Resultado negativo é o desenvolvimento de coloração amarela no meio. As duas outras provas ocorrem de modo idêntico ao meio SIM.

4.4.7 Meio MIO – MOTILIDADE, INDOL, ORNITINA (*Newprov Laborclin*)

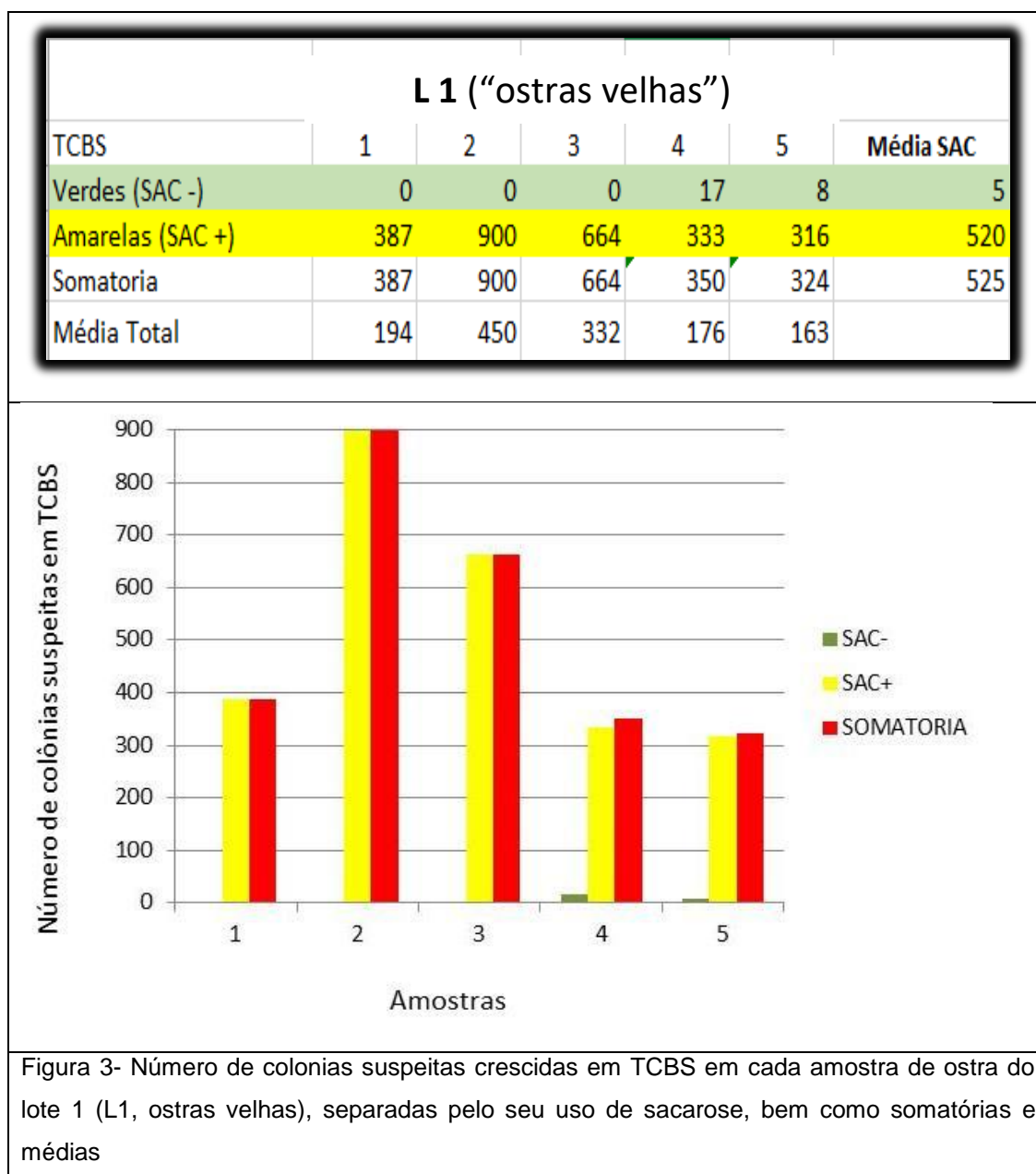
As bactérias foram inoculadas com agulha metálica no meio. Para a prova de ornitina positivo desenvolvimento de coloração que passa do amarelo ao púrpura no meio; Negativo: desenvolvimento de coloração amarela no meio. As duas outras provas ocorrem de modo idêntico ao meio SIM.

4.4.8 Caldo ARGININA (*Newprov Laborclin*)

O caldo Arginina dehidrolase possui peptonas e extrato de carne que favorecem o crescimento bacteriano. A fermentação de glicose abaixa o pH e este fica amarelo. Se ocorrer atividade da enzima Arginina Dehidrolase o pH aumentará, devido a transformação da arginina em ornitina (posteriormente em putrescina), amônia e dióxido de carbono e o meio voltará a apresentar uma coloração roxa, devido a viragem dos indicadores de pH, púrpura de bromocresol e vermelho de cresol. O meio com cor amarelada é prova negativa para a enzima arginina dehidrolase. O meio com tonalidade de roxo é prova positiva para a enzima arginina dehidrolase .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem e categorização das colônias suspeitas, crescidas no meio TCBS, apresentados também sob a forma de gráfico de barras, onde os dois lotes de ostras são individualmente representados, estão nas figuras 3 e 4.



L2 ("ostras frescas")						
TCBS	1	2	3	4	5	Média SAC
Verdes (SAC -)	42	9	6	5	75	27
Amarelas (SAC +)	10	1	96	19	21	27
Somatoria	52	10	102	24	96	
Média Total	26	5	52	13	49	

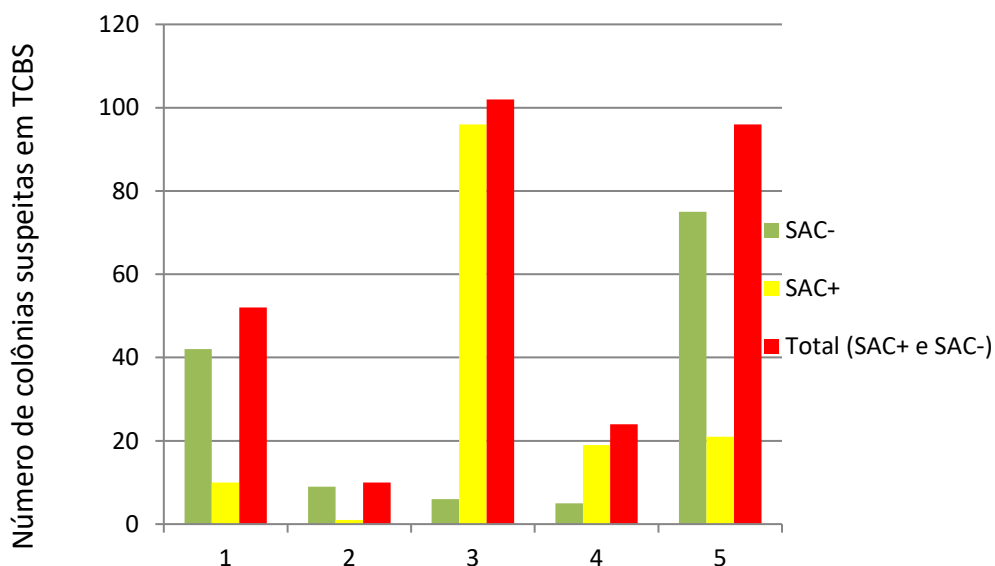


Figura 4- Número de colonias suspeitas crescidas em TCBS em cada amostra de ostra do lote 2 (L2, ostras frescas), separadas pelo seu uso de sacarose, bem como somatórias e médias.

Considerando o total de placas inoculadas, o crescimento de colônias suspeitas em TCBS foi de quase 100%, exceto em uma das amostras do lote II(OF), que foi excluída por ausência de crescimento. Se não houver quantidade suficiente e consistência adequada de meio, o micro-organismo não consegue sobreviver nem se multiplicar. É importante que as placas sejam preparadas, preferencialmente na véspera do seu uso, de acordo com o número de amostras a ser inoculadas.

Em L1 cresceu maior quantidade de colônias SAC+ (2.600), enquanto que o total geral de colônias foi de 2.625. Já em L2, o crescimento foi semelhante entre as colônias amarelas e as verdes, ou seja 147 SAC+ e 137 SAC-. O total geral para L2 foi de 284 colonias. Se formos comparar os dois lotes de ostras, vemos que o total de colônias suspeitas crescidas em L1 foi praticamente 10 vezes maior do que em L2. Como explicar esses resultados? Por que quase não houve crescimento de colônias verdes no lote de ostras velhas? Será que bactérias *Vibrio* sacarose positivas, como o *V. Cholerae*, progridem melhor com o passar do tempo do que vibrios sacarose negativos? Ou será que houve crescimento de outros tipos de bactérias como espécies de *Aeromonas*, de *Proteus*, e outras, por exemplo?

Tabela 1- Resultados (%) dos testes conduzidos com as diversas sub amostras para triagem de suspeitos de *V. parahaemolyticus* em ostras oriundas da Ponta Oeste da Ilha do Mel, PR

Testes	L1 (“ostras velhas”)		L 2 (“ostras frescas”)	
	% positivo	% negativo	% positivo	% negativo
Crescimento em TCBS	100	0	90	10
Coloração de GRAM	0	100	0	100
Oxidase	90	10	7	63
Catalase	40	60	21	49
Sulfeto	0	100	20	80
Indol	0	100	36	54
Motilidade	30	70	90	10
Resistência 5% NaCl	80	20	100	0
Resistência 7% NaCl	0	100	70	30
Arginina	70	30	56	24
Lisina	100	0	Não testou	Não testou
Ornitina	100	0	Não testou	Não testou

Recomenda-se que os testes de triagem sejam feitos com amostras crescidas em meio de cultura incolor. O teste de oxidase, em particular, não deve ser feito com as amostras do meio TCBS, pois o corante existente nesse meio pode interferir nos resultados. No lote L2, o teste de oxidase foi conduzido com amostras diretamente pegadas do TCBS, portanto, aqueles 7% de positividade podem ter sido em função da interferência dos corantes. Sabe-se que bactérias *Vibrio* são em geral oxidase positivas.

Provas bioquímicas	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Gram	negativo
Oxidase	positivo
Motilidade	positivo
Indol	positivo
Sulfeto	negativo
Sacarose	negativo
Lisina	positivo
Arginina	negativo
Ornitina	positivo
Resistencia a NaCl 7%	positivo

Figura 5- Perfil bioquímico simplificado de *Vibrio parahaemolyticus*

No teste SIM, apenas 30% das amostras de L1 apresentaram motilidade, diferente do teste realizado com o L2, em que 90% foram motilidade positiva; O resultado de L1 não é coerente com o esperado para bactérias *Vibrio*, pois elas possuem flagelo e deveriam se movimentar no meio de cultura. Em todo caso, é preciso considerar a possível presença de outras bactérias “invasoras” que naturalmente não se movimentam. A diferença no tempo de armazenamento das amostras antes das análises também pode ter interferido na ausência ou “preguiça” de motilidade das bactérias. Ostras de L1 estavam estocadas em geladeira por 15 dias antes das análises, portanto, apresentavam ressecamento, ou seja, ausência de líquido intervalvar. Então, foi preciso adicionar água para se conseguir coletar 100µL de amostra para inoculação nas placas de TCBS; É

importante considerar que, quanto mais passos se adicionam à metodologia do trabalho em bacteriologia, maior chance de contaminação das amostras.

O tempo e o modo de armazenamento dos meios de cultura também podem interferir nos resultados. Uma partida do meio SIM havia sido preparada havia aproximadamente 15 dias, enquanto outra partida estava apenas com 24h de preparação, portanto, bem fresca. É sempre fundamental garantir “comida” de boa qualidade para o crescimento adequado dos micro-organismos. Um erro de formulação também pode ter ocorrido com o meio SIM, por falta de NaCl. Geralmente adiciona-se de 1 a 2% de sal para favorecer o crescimento das bactérias do gênero *Vibrio* que são naturalmente halofílicas. Sendo assim, o teste de resistência a diferentes concentrações de NaCl é fundamental na separação de algumas espécies de *Vibrio* de interesse. Em L2, 70% das subamostras cresceram no TSA com 7% de concentração de sal. Tal resultado favorece a suspeita de que possa haver *V. parahaemolyticus*, dentre os isolados, já que esta espécie resiste a maiores salinidades (até 9%) em relação às suas companheiras. Algumas espécies de *Vibrio cholerae* estão entre os menos tolerantes ao NaCl.

Quanto à eficiência do meio TCBS, sempre se questiona: É um meio seletivo mesmo? Sabe-se que ele apresenta bons índices de eficácia, perto de 90% de capacidade de seleção. CASTANHO (2014) selecionando *Vibrio* spp. de ostras comercializadas em mercado de pescado de Paranaguá, obteve 87% de acerto do TCBS, o que ela considerou satisfatório. Em pesquisa similar, Belarmino (2015) obteve 100% de acerto, já que todos os suspeitos crescidos no TCBS foram confirmados como *Vibrio* spp nos testes bioquímicos. De todo modo, como há o risco do crescimento de bactérias “invasoras”, que imitam características dos víbrios, é sempre importante realizar a prova sulfeto, presente no meio SIM.

O meio de cultura SIM contém peptonas e tiosulfato de sódio como substratos sulfurados, além do sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), que atua como indicador da presença de H_2S . Como o H_2S é incolor, portanto não visível, no sulfato ferroso amoniacal, o ferro combina-se com o H_2S formando sulfureto de ferro que é um precipitado negro insolúvel. Houve reação positiva

em sulfeto para duas amostras de L2, (tabela 1). Há grande chance das amostras sulfeto positivo serem bactérias do gênero *Proteus*, pois sabe-se que esse gênero é um dos possíveis contaminantes (invasores) do ágar TCBS. As amostras foram excluídas, pois espécies de *Vibrio* não produzem reação positiva ao sulfeto (figura 5). Em L1 não houve nenhum caso de sulfeto positivo, então todas seguiram adiante para as demais provas.

Além do SIM, foram usados para L1 dois outros meios multiprovas, LMI e MIO. Apesar de o objetivo principal ter sido testar os aminoácidos lisina e ornitina, tentamos reconferir as amostras para indol e motilidade também nestes testes. De todo modo, o teste de LISINA, em particular, é bem importante quando se quer selecionar *V. parahaemolyticus*.

A incidência de espécies de *Vibrio* de importância sanitária em alimentos de origem marinha, destinados ao consumo humano, vem sendo relatada no Brasil. BELARMINO (2015) investigou *Vibrio* spp. em ostras vendidas em mercado de pescados, em Paranaguá, PR. As análises, feitas 24 horas pós compra, resultou em de um total de 1984 colônias suspeitas crescidas em TCBS, sendo 1779 sacarose positivas e somente 205 sacarose negativas. Dos isolados testados, todos apresentaram resistência a concentrações 8% de NaCl, característica particular de *V. parahaemolyticus*.

No atual estudo, o crescimento de colônias SAC+ (2.600) no lote L1, onde as ostras foram estocadas por duas semanas, foi expressivamente maior do que de colônias SAC - (25), resultados similares aos de Belarmino.

Considerando os 100% de acerto do TCBS no trabalho de Belarmino, o maior contingente de bactérias presentes nas ostras estocadas por 24h pós-compra, foi de sacarose positivas. O autor discute se o resultado se deve ao fato de que, por exemplo, *V. cholerae* se multiplica preferencialmente em condições de higiene precária e menores salinidades, situação em que se encontram as ostras expostas, sem refrigeração ou demais cuidados básicos, a medida que o tempo passa. Mesmo mantendo as ostras em caixa isotérmica, as amostras de Belarmino, em geral, apresentaram menor resistência na abertura das suas

valvas, o que é um sinal de perecibilidade de moluscos bivalves. Apesar de ter sido mantidas sob refrigeração, as ostras do lote 1 deste trabalho poderiam se enquadrar na explicação de Belarmino.

O risco microbiológico por *V. parahaemolyticus* foi avaliado em ostras nativas *C. rhizophorae* cultivadas na Baía de Todos os Santos, BA (COSTA *et. al*, 2009). Além das ostras, a água de cultivo, e a água do processo de depuração também foram avaliadas, resultando em uma frequência de vibrios de 87,5%, 57,1% e 42,8%, respectivamente (RODRIGUES, 2009).

FERREIRA (2013) conduziu as primeiras investigações sobre *Vibrio* spp. em águas no litoral do Paraná, registrando a presença de vibriões em todos os 5 pontos de amostragem no balneário Pontal do Sul. A maior incidência foi de espécies SAC⁺. Recentemente, a presença de *Vibrio* spp. foi pesquisada em águas da ostreicultura da Ponta Oeste da Ilha do Mel, baía de Paranaguá (CHALCOSKI, 2014). As contagens de *Vibrio* foram aumentando conforme o aumento da temperatura ambiental, embora as quantidades de bactérias tenham sido pequenas (de 1×10^3 a 3×10^3 colônias/100mL água).

CHALCOSKI (2014-II) também trabalhou com amostras de ostras da Ponta Oeste da Ilha do Mel, registrando contagens de *Vibrio* spp. de 0 a 25g a $19 \times 10^3/25g$ de amostra. Das 34 amostras de ostras analisadas, 37,5%, também estavam contaminadas por uma ou mais espécies de *Vibrio*. As ostras de Medeiros apresentaram variação de 0,12 a 0,28 *Vibrio/g* de amostra (ou 0,4 a 139,7 *Vibrio* suspeitos/g de amostra), quantidades também insignificantes quando comparadas com a literatura. No entanto, deve-se lembrar de que não foram identificadas as espécies de *Vibrio* nesses dados. Alguns vibriões podem causar doenças mesmo em pequenas quantidades devido a sua virulência.

Os limites de micro-organismos tolerados pela RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 12/01 do Ministério da Saúde, para moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, referem-se apenas aos moluscos não consumidos crus (10^3 *V. parahaemolyticus/g* do produto), apesar de, na prática, o consumo de

bivalves ocorrer predominantemente *in natura*. Ressalta-se que não foram confirmadas as espécies de *Vibrio* nas diversas amostras, de modo que não se sabe sobre a patogenicidade dos isolados.

Comunidades do leste paranaense vêm se interessando por cultivos de moluscos bivalves, em que a comercialização destes, se torna uma fonte de renda alternativa. É, então, importante monitorar esses cultivos não só para as comunidades, mas também para os consumidores. Cada trabalho que gere resultados nesta área de conhecimento é potencialmente agregador de base para o estabelecimento de um programa sanitario desenhado para a aquicultura local.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O planejamento original do projeto não foi integralmente cumprido conforme desejado devido a problemas diversos de logística, de tempo disponível, de material e falta de padronização de técnicas ao longo do trabalho. Houve também, certa dificuldade para operacionalizar tantos meios e testes bioquímicos com o rigor imposto pela microbiologia. Por causa da falta de acurácia, não é aconselhável usar os dados do trabalho para publicações científicas. No entanto, a execução do experimento foi o mais criteriosa possível, tentando seguir padrões de higiene e toda meticulosidade que o trabalho de isolamento e identificação bacteriana em laboratório exige.

7. CONCLUSÕES

Os objetivos aqui propostos foram atingidos parcialmente. Foi possível quantificar colônias em função do uso de sacarose do meio; Com a execução das provas bioquímicas complementares, foi possível também selecionar colônias suspeitas de *Vibrio parahaemolyticus* para posterior confirmação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ALMEIDA FILHO, E. S. de; VALENTE, A.M.; STUSSI, J. S. P.; OLIVEIRA, L. A. T. de; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. de P. *Vibrio vulnificus* em pescado, uma revisao. **Higiene Alimentar**, Sao Paulo, v. 18, n. 116, p. 23-28, jan./fev. 2004
- 2) CASTANHO, M. **Bactérias do gênero *Vibrio* em ostras comercializadas em Paranaguá, PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Paraná, 2014.
- 3) BELARMINO, W.T. ***Vibrio* spp. Em ostras do mercado de Paranaguá – PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Paraná, 2015.
- 4) CAVALLI, R.O; Ferreira, J. F. **O futuro da pesca e da aquicultura marinha no Brasil: a maricultura.** Disponível em:
<http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252010000300015&script=sci_arttext> Acesso em: 11/04/2016.
- 5) CHALCOSKI, B. M. S. **Bactérias do gênero *Vibrio* em águas de cultivo de ostras na ponta oeste, Ilha do Mel, Paranaguá, PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Paraná, 2014.
- 6) CHALCOSKI, G. M. S. **Pesquisa de bactérias de gênero *Vibrio* em ostras cultivadas na Ponta Oeste, Ilha do Mel, Paranaguá-PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal do Paraná, 2014.
- 7) DE SCHRYVER, PETER; DEFOIRDT, TOM; SORGELOOS, PATRICK; Early Mortality Syndrome Outbreaks: **A microbial management issue in shrimp farming? PLOS Pathogens**, v.10, n.4, p.1-2, 2014. Disponível em:
<<http://journals.plos.org/plospathogens/>> Acesso em 01 de março de 2016.

8) FERREIRA, T. M. **Quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* em Pontal do Sul, litoral do Paraná-PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) -Universidade Federal do Paraná-2013.

9) SANTOS, J. S. ***Vibrio* spp. Em águas e ostras cultivadas na comunidade de Medeiros, Paranaguá, PR.** (Trabalho de Conclusão de Curso) -Universidade Federal do Paraná- 2015.

10) LOC TRAN; NUNAN, LINDA; REDMAN, RITA M.; MOHNEY, LEONE L.; PANTOJA, CARLOS R.; FITZSIMMONS, KEVIN; LIGHTNER, DONALD V. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, vol.105, p 45-55, 2013.

11) NEWMAN, S. G. What can shrimp farmers do about EMS (AHPNS\ AHPND). **Seafood Source**, 5 of May, 2015. Disponível em:< <http://www.seafoodsource.com/blogs/global-aquaculture-issues> > Acesso em 02 de março de 2016.

12) MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/>

13) ROJAS,M.V.R.; MATTÉ, M. H.; DROPA, M.; SILVA, MIRIAM L. & MATTÉ, GLAVUR, R. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussel in São Paulo, Brazil. **Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo**[online]. Vol.53, n.4, p. 201-205. 2011.

14) ROMALDE, J. L.; DIÉGUEZ, A. L.; LASAAND,A; BALBOA,S. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. **Frontiers in Microbiology**, v.4, p.1-11, 2014.

15) RODRIGUES, L.A.P; Filho, C. D. C. **Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* nas etapas de beneficiamento de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), cultivadas na Baía de Todos os Santos - BA e determinação dos pontos críticos de controle.** Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000200030&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 12/04/2016.

16) VILAR, T. C. **Crescimento da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* cultivada em Barra de São Miguel, Alagoas, Recife – PE , 2012.** Disponível em:
<<http://repositorio.ufpe.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/12211/dissertacao%20final%20-Thiago%20Vilar%20DOCEAN.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.
Acesso em: 25/07/2016.

9. ANEXOS

Conjunto de dados obtidos para o lote 1 (L1, “ostras velhas”) e para o lote2 (L2, “ostras frescas”) de ostras, ao longo experimento

OSTRAS VELHAS		RESULTADOS																		
03/06/2016																				
TCBS	1				2				3				4				5			
VERDES	0				0				0				17				8			
AMARELAS	387*				900*				664*				333				316			
TOTAL	387				900				664				350				324			
04/06/2016																				
Sub amostr TCBS	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
quantid crescim	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+++	+	-	++	-	-	-	++	-	-
GRAM			-	-																
OXIDASE					-		+	+	+		+	+		+				+		
CATALASE					+		+	+	+		-	-		-				-		
TSA 2%				TODOS COM CRESCIMENTO +																
TSA 5%			-	-	+		+	+	+		+	+		+				+		
TSA 9%			-	-	-		-	?	-		-	-		-				-		
S			-	-	-		-	-	-		-	-		-				-		
I			-	-	-		-	-	-		-	-		-				-		
M			-	-	+		-	+	-		-	-		-				+		
L			+	+	+		+	+	+		+	+		+				+		
M			-	-	+			+	-		-	-		-				+		
I			-	-	-		-	-	-		-	-		-				-		
ARGININA			-	-	+		-	+	+		+	+		+				+		
M			-	-	+			+	-		-	-		-				+		
I			-	-	-		-	-	-		-	-		-				-		
O			+	+	+		+	+	+		+	+		+				+		
+++ = crescimento em todo o quadrante																				
++ = crescimento em metade do quadrante																				
+ = esparsas																				
? Inconclusiva duvida																				

RESULTADOS																					
ostras frescas																					
10/06/2016																					
	AMOSTRA				AMOSTRA				AMOSTRA				AMOSTRA				AMOSTRA				MÉDIA DAS AMOSTRAS
TCBS	1				2				3				4				5				
VERDES	42				9				6				5				75				
AMARELAS	10				1				96				19				21				
TOTAL	52				10				102				24				96				
11/06/2016																					
SUB AMOSTRA TCBS	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
quant crescim	+++	-	+++	-						+++	+		+++		+++		++	++	+++	+++	
GRAM	-			-		E				-			-		-		-	-	-	-	
OXIDASE	-									+			-		-			-	-	-	
CATALASE	-					X				+			+		+			-	-	-	
TSA 2%	+			+						+	+		+		+		+	+	+	+	
TSA 5%	+			+		C				+	+		+		+		+	+	+	+	
TSA 7%	+			-						+	-		+		+		-	+	+	+	
S	-			-		L				+	+		-		-		-	-	-	-	
I	-			X						-	-		+		+		-	+	+	-	
M	+			+		U				+	+		+		+		+	+	+	-	
L		NÃO TESTOU																			
M		NÃO TESTOU				I															
I		NÃO TESTOU																			
ARGININA	-			X		D					-		+		-		+	+	+	+	
M		NÃO TESTOU																			
I		NÃO TESTOU				O															
O		NÃO TESTOU																			
VIBRIO									NÃO NÃO												
Σ SUB AMOSTRAS %	50				0				50				50				100				
+++ = crescimento em todo o quadrante																					
++ = crescimento em metade do quadrante																					
+ = esparsas																					
X DADO PERDIDO																					